

성장인자 Fibroblast Growth Factor, Leukemia Inhibitory Factor 및 Interleukin-1이 근육모세포 증식에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 재활의학교실 및 ¹근육병재활연구소

박윤길¹ · 문재호¹ · 박은숙 · 김 진¹ · 송남규

Effects on Myoblast Proliferation by Fibroblast Growth Factor, Leukemia Inhibitory Factor and Interleukin-1

Yoon Ghil Park, M.D., Ph.D.¹, Jae Ho Moon, M.D.¹, Eun Sook Park, M.D., Ph.D., Jin Kim, Ph.D.¹ and Nam Kyu Song, M.D.

Department of Rehabilitation Medicine and ¹Rehabilitation Institute of Muscular Disease, Yonsei University College of Medicine

Objective: Recently, cultured myoblast transplantation has been extensively studied as a gene complementation approach in such genetic diseases as Duchenne muscular dystrophy (DMD). In the present work we investigated the stimulating effects of the growth factors, such as basic fibroblast growth factor (bFGF), leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-1 (IL-1), on growth rate and differentiation of myoblast.

Method: Human myoblasts were cultured from biopsy and treated in vitro with various concentration of bFGF, LIF and IL-1. In serum-free defined medium the following observation were made to evaluate differentiation.

Results: bFGF and LIF except IL-1 were found to have

stimulating effect of myoblast proliferation comparing to control group ($p < 0.05$), yet there were no statistically significant differences among each growth factors ($p > 0.05$). The most significant growth stimulation of myoblasts in culture was achieved by adding 3.0 ng/ml of bFGF, producing a stimulation effect up to 2.01-fold. All myoblasts treated with growth factors differentiated into myotube.

Conclusion: Our findings indicate that bFGF and LIF stimulate the proliferation of myoblast, which may result in an effective way in producing large numbers of myoblasts for clinical myoblast transplantation in DMD patients. (*J Korean Acad Rehab Med* 2002; 26: 426-431)

Key Words: Myoblast, Growth factor, Basic fibroblast growth factor (bFGF), Leukemia inhibitory factor (LIF), Interleukin-1 (IL-1)

서 론

근육질환 중 뒤시엔느(Duchenne)형 근디스트로피는 점차적인 근력약화를 일으키는 질환으로 성염색체에 의해 열성 유전되며 X 염색체의 단완(Xp21)에 위치한 디스트로핀(dystrophin) 유전자의 변이에 의해 출생 남아 3,500명 중 1명의 빈도로 발생한다.^{2,17,32,50} 뒤시엔느형 근디스트로피는 대개 2~3세에 근력약화에 의한 보행 장애 등의 임상증상이 나타나기 시작하여 대부분 12세 이전에 보행능력을 상실하게 되며, 평균 사망 연령이 20세인 치명적인 질환이다. 현재까지는 근본 원인을 치료할 수 있는 방법이 확립되지 않았으며 병의 진행과 합병증을 최소화하는 물리치료, 운

동치료 및 호흡 재활치료 등 재활의학적 치료에 그치고 있다.⁴³ 다행히 최근 정상적인 근육모세포(myoblast)를 환자의 근육에 주입하면 정상 세포가 환자의 근육세포와 융합되어 디스트로핀 단백질을 생성하도록 유도하는 근육모세포 이식법이 개발되어 그 효과에 대한 연구가 보고되고 있다.^{21,33,36} 그러나 배양과정 중 비근육생성 세포(non-myogenic cell), 특히 섬유모세포(fibroblast)의 과도한 성장이 큰 장애로 나타나며 더구나 정상 성인의 근육조직에서 얻어진 근육모세포의 배양은 태아 조직에서 유리된 세포와 비교하여 성장률이 현저히 떨어지므로 이를 분리하고 배양하는 것이 쉽지 않다.^{1,46,47}

분리된 근육모세포는 배양 과정 중 근관세포(myotube)로 분화하지 않고 위성세포(satellite cell) 상태로 증식되어야 세포이식에 이용할 수 있는데, 이러한 유지 방법 중 하나가 성장인자(growth factor)를 첨가하여 세포의 분화와 성장을 조절하는 것이다. 그러나 성장인자는 섬유모세포에도 같이 영향을 줄 수 있어 근육모세포에만 작용되는 것이 중요한 요소이다. 과거 근육모세포의 증식을 자극하는 것으로 알려진 성장인자로는 interleukin 1과 6 (IL-1, IL-6), fibroblast

접수일: 2002년 3월 13일, 게재승인일: 2002년 6월 11일

교신저자: 박윤길, 서울시 강남구 도곡동 146-92

☎ 135-270, 영동세브란스병원 재활의학과

Tel: 02-3497-3493, Fax: 02-3463-7585

E-mail: drtlc@yumc.yonsei.ac.kr

본 연구는 연세대학교 의과대학 2001년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음(과제번호: 2001-11).

growth factor (FGF), leukemia inhibitory factor (LIF), epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor-beta (TGF-beta) 등이 있는데 이들은 단독 또는 상호작용에 의해 영향을 주는 것으로 밝혀졌다.^{3,4,12,38)} 이 중 FGF는 섬유모세포의 증식을 유도하는 것으로 알려졌으며 인체에서도 신장의 섬유모세포 증식에 중요한 역할을 한다는 연구가 있다.^{34,8,42)} 그 외에도 FGF는 근육모세포의 성장을 촉진하고 근관세포로 분화를 억제하는 기능이 있는 것으로 보고되고 있다.^{12,49)}

LIF는 murine myeloid leukemic cell의 분화를 유도하는 역할을 하는 것으로 알려진 cytokine으로 줄기세포(stem cell)의 분화를 억제하고 증식을 유도하는 데 많이 이용되고 있다.^{16,31)} 또한 mouse와 human myoblast의 증식을 유도하며 분화를 억제하는 작용을 한다.^{3,4,25)}

최근 Interleukin에 의한 근육모세포 증식 조절이 논란이 되고 있는데, IL-6는 근육모세포의 증식에 관여하지만³⁾ IL-2는 3T3 fibroblast 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다.³⁸⁾ IL-1은 염증반응뿐만 아니라 생체 내에서와 배양된 여러 세포들에서도 다양한 작용을 일으키는 것으로 밝혀지고 있다. 이 중 하나가 섬유모세포 증식에 관여하는 것으로 알려져 있으나 근육모세포에 대한 연구는 드물 뿐만 아니라 주로 심근세포 배양에서 관찰된 결과를 보고한 것이다.³⁵⁾

본 연구의 목적은 세포의 증식을 위해 사용되는 성장인자가 인체 골격근의 근육모세포 증식과 분화에 어떤 영향을 미치는지 조사하여 향후 효율적인 근육모세포 배양에 이용하고자 한다.

연구대상 및 방법

1) 연구대상

2001년 8월부터 2002년 1월까지 연세의대 영동세브란스 병원 외과계 수술 중 얻어진 인체 근육조직을 사용하였다. 모든 공여자는 수술 전에 신체 검진과 혈액 검사를 통해 신경근육계 질환의 여부를 확인하였다.

2) 방 법

(1) 세포 분리 및 일차배양(primary culture): 채취된 근육 조직을 phosphate buffered saline (PBS; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)에 넣어 세척한 다음 칼로 잘게 다져 분해용액(dissociation solution; 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA 2 ml, collagenase-type IV 4 ml, 1×PBS 14 ml)으로 37°C, 5% CO₂에서 1시간 동안 처리하여 세포를 분리하였다. 분해용액의 작용을 약화시키기 위해 20% fetal bovin serum (FBS; GIBCO)을 포함한 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM; GIBCO)을 넣은 후, 1,100 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 침전된 세포에 20% FBS-DMEM 세포배양액과 gentamycin (GIBCO)을 50 ug/ml로 첨가하여 부유시킨 후 80

cm² culture flask (NUNC, Roskilde, Denmark)에 1×10⁶/ml의 세포수로 접종하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 유지하였으며 배양액은 일주일 경과한 후 교환하였다. 배양 접시에서 세포가 차지하는 비율(confluence)이 50% 이상이 되면 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA로 세포를 배양접시에서 분리시키고 원심 분리하여 계대배양을 시행하였다. 이 후 배양액은 3일마다 교체하였다.

(2) 근육모세포 증식에 대한 성장인자(bFGF, LIF, IL-1)의 영향: 일차 배양된 근육모세포와 섬유모세포의 혼합 세포군을 나누어, 제1군은 성장인자가 포함되지 않은 20% FBS-DMEM만을 이용하여 배양한 대조군으로 하였고, 제2군은 basic FGF (bFGF; GIBCO)를 1.5 ng/ml, 3.0 ng/ml, 30.0 ng/ml의 농도로, 제3군은 LIF (Sigma)를 0.03 ng/ml, 0.3 ng/ml, 3.0 ng/ml로, 제4군은 IL-1 (PharMingen, San Diego, CA, USA)을 0.01 ng/ml, 0.1 ng/ml, 1.0 ng/ml의 농도로 투여하였다. 6일간 배양한 후 세포수를 측정하여 결과를 분석하였다.

(3) 근육모세포 관찰 및 분석-면역화학 염색: 배양된 세포는 슬라이드에서 tris-buffered saline (TBS; DAKO corporation, Carpinteria, CA, USA)으로 세척한 후 실온에서 10분간 건조시켰다. 이후 10분간 3% H₂O₂를 처리하여 내인성 과산화 효소를 차단한 다음 TBS로 세척하였다. 일차항체로 monoclonal mouse anti-human desmin (DAKO)을 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 DAKO LSAB system (DAKO)를 이용하여 biotin이 부착된 이차항체를 15분간 실온에서 처리하고 다시 TBS로 세척하였다. Streptavidin-horseradish peroxidase로 15분간 반응시킨 후 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)로 발색한 다음 hematoxylin으로 대조 염색하였다. Desmin으로 양성반응이 나타나 붉게 염색된 세포를 근육모세포로 판독하였고 hematoxylin에 의해 대조 염색되는 세포를 섬유모세포 등 비근육생성 세포(non-myogenic cell)로 판단하였다 (Fig. 1). 매회 실험마다 14구획씩으로 나누어 광학현미경으로 숫자를 파악하여 대조군에 대한 근육모세포의 비율 구하였다.

(4) 근육모세포의 분화: 성장인자로 처리된 근육모세포가 근섬유로 분화하는 기능을 유지하고 있는지 알아보기 위해 각 단계의 실험이 끝난 후 나머지 세포를 1% FBS-DMEM에서 배양하면서 근관세포 형성을 위상차 현미경을 통해 확인하였다.

3) 통계처리

각 단계의 실험은 오차를 줄이기 위하여 3회 이상 반복하였으며 수집된 자료는 SPSS 통계 프로그램(SPSS for Windows 10.0)을 이용하여 비모수검정법인 Mann-Whitney test로 대조군과 실험군 두 집단 간에 차이를 검정하였으며, 같은 성장인자 내에서 농도 차이에 따른 평가에는 Kruskal-Wallis test를 이용하였다.

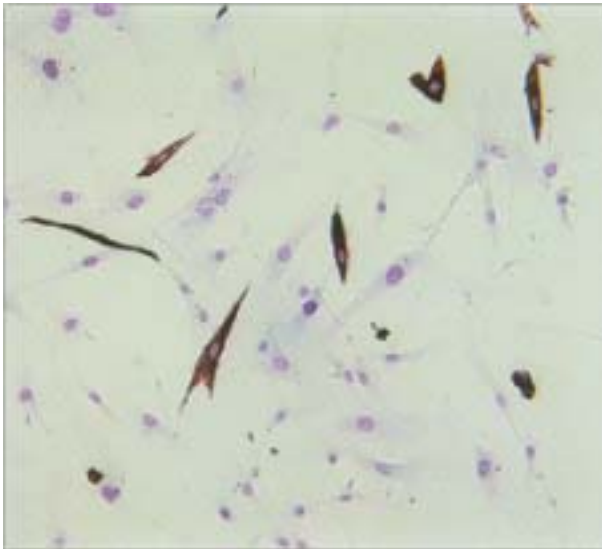


Fig. 1. Myoblasts were positively stained for desmin (dark brown) and counterstained fibroblasts in the background (×100).

Table 1. Stimulating Effects of Growth Factors on Myoblast Proliferation

Group	Growth factor	Ratio to control ¹⁾ (range)
Group 2	bFGF 1.5 ng/ml	1.02 (1.01~2.43)*
	bFGF 3.0 ng/ml	2.01 (1.74~2.77)*
	bFGF 30.0 ng/ml	1.49 (1.24~2.83)*
Group 3	LIF 0.03 ng/ml	1.79 (1.33~1.90)*
	LIF 0.3 ng/ml	1.58 (1.29~1.62)*
	LIF 3.0 ng/ml	1.17 (1.03~1.30)*
Group 4	IL-1 0.01 ng/ml	0.97 (0.64~1.75)
	IL-1 0.1 ng/ml	0.73 (0.61~1.30)
	IL-1 1.0 ng/ml	0.64 (0.63~1.10)

Values are median.

1. Group 1

*p<0.05

결 과

1) 근육모세포 증식에 대한 성장인자의 영향

성장인자 투여가 근육모세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 배양 후 6일이 지나서 세포수를 측정하여 대조군과 비교한 결과 IL-1을 투여한 제4군을 제외하고 bFGF와 LIF를 투여한 제2군과 제3군에서는 통계적으로 유의한 증가가 있었다(p<0.05). 또한 성장인자의 농도에 따른 변화는 LIF가 0.03 ng/ml, bFGF는 3.0 ng/ml를 투여했던 군에서 증식이 가장 많이 일어났다(Table 1). 그러나 같은 성장인자 내에서 농도에 따른 근육모세포 증식은 통계적으로 유의한

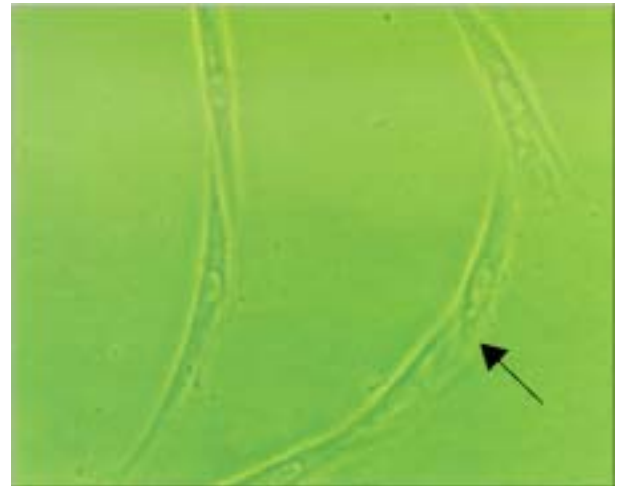


Fig. 2. Differentiation of myoblasts into myotubes. Myoblasts growing in growth factor containing medium were transferred to 1% FBS-DMEM. Five to seven days later the cells were examined by contrast microscope. Myoblasts were fused into myotubes (arrow) (×400).

차이가 없었다(p>0.05).

2) 근육모세포의 분화

각 성장인자로 처리된 실험군에서 근육모세포의 분화 기능을 관찰한 결과 모든 군에서 배양액 교환 후 5~7일이 지나서 근관세포로 분화되었다(Fig. 2).

고 찰

최근 뒤시엔느형 근디스트로피를 포함한 근이영양증 환자의 치료를 위해 유전자 치료와 줄기세포(stem cell) 이식 및 조직 배양을 이용한 치료 등이 활발히 연구되고 있다. 이와 더불어 근육모세포 이식이 향후 실현 가능한 치료법으로 여겨지고 있는데 동물실험을 통하여 어느 정도 효과가 확인되었고, 이후 시행된 임상실험에서도 주입된 정상 근육모세포가 환자의 근육세포와 융합하여 디스트로핀을 생성하고 정상 근육세포로 복원되어 근력을 증진시키는 것으로 보고된 바 있다.^{14,15,20,22,24,26,29,45)} 그러나 이 방법은 현재까지 이식 후 세포 확산도의 저하와 면역거부 반응 등 여러 가지 제한점이 있으며,^{5,10,13,19,30,41,44)} 이를 극복하기 위한 방법 중의 하나가 순수한 다량의 근육모세포 배양과 면역거부 반응의 억제이다. 따라서 근육모세포의 순수배양은 근육세포이식의 기초이며 실험실 연구의 중요한 단계이다. 근육모세포의 증식과 분화에 관련된 여러 가지 성장인자들 중 FGF는 근육모세포의 증식을 촉진하며 근육모세포가 근관세포로 분화하는 과정을 억제하는 것으로 알려져 있으나 이 같은 결과는 척추 동물 내에서도 종에 따라 차이가 있는 것으로 보고되었다.¹²⁾ 이러한 근육모세포에 대한 영향

은 acidic FGF보다 basic FGF가 20배 이상 강한 작용을 가지고 있으며 bFGF는 myogenic regulatory factor인 MyoD 발현을 불활성화시키고 이와 더불어 MyoD나 Myf-5에 의한 myogenin gene의 활성화를 억제하여 분화가 일어나지 않게 유도하는 것으로 알려져 있다.^{11,48)} Gospodarowicz 등¹²⁾은 FGF를 bovine myoblast에 1.0 mg/ml를 투여하여 배양한 후 대조군과 비교한 결과 10배 이상의 증식 효과를 보았다고 하였다. 그러나 이때 사용된 FGF는 정제되지 않은 상태의 추출물이어서 많은 양이 필요하였을 것으로 생각된다. 본 실험에서 bFGF를 사용하여 근육모세포의 증식을 상승시키는 결과를 얻었으며 특히 3.0 ng/ml에서 대조군과 비교하여 2.01배의 증식 효과가 있었다.

LIF는 embryogenic stem cell의 분화를 억제하고 골재 형성을 촉진하며,³⁵⁾ 근육모세포의 증식을 유도하며 분화를 억제하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.^{3,4,25)} Austin과 Burgess 등⁴⁾은 LIF를 0.012 ng/ml 투여하여 mouse myoblast를 대조군에 비해 30배 이상 증식시킬 수 있었고 고농도군에서 오히려 약간의 증식억제 효과가 나타났다고 보고하였다. 본 실험에서 0.03 ng/ml, 0.3 ng/ml, 3.0 ng/ml 세 가지 농도 중 0.03 ng/ml에서 대조군보다 1.79배로 근육모세포가 증가되어 고농도보다 저농도에서 근육모세포의 증식 비율이 커지는 양상을 보였으나 통계적으로 의미는 없었다($p > 0.05$).

Interleukin은 그 종류에 따라 세포증식에 대한 결과도 다양하게 나타난다. IL-1은 염증반응에 주로 관여하는 것 외에도 최근 세포 성장과 증식에 다양한 작용을 일으키는 것으로 밝혀지고 있다. 이 중 염증반응과 연관되어 섬유모세포의 증식을 촉진 혹은 억제한다는 상반된 보고가 있는데 이는 섬유모세포가 유리된 조직과 장기에 따라 다양한 결과를 나타내었다.^{9,28,37,39,40)} 이러한 작용은 IL-1이 단백질 합성 단계가 아니라 DNA와 RNA의 합성에도 영향을 주기 때문이다.^{6,7,27)} IL-1의 근육모세포에 대한 영향은 주로 심근모세포를 이용하여 실험하였는데 rat의 심근세포 배양에서 IL-1이 간접적으로 단백질과 RNA 합성을 감소시키며,¹⁸⁾ 최근에는 IL-1이 심근세포의 성장은 유도하면서 섬유모세포의 증식을 억제하는 것으로 보고되었다.⁴⁹⁾ 그러나 골격근세포에 대한 IL-1의 영향을 세포배양과정에서 관찰한 실험은 드물어서 IL-1이 tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)와 같이 근육모세포의 증식과 분화를 억제하며 저농도에서 억제에 대한 상호작용이 증가한다는 것 외에 순수 배양을 위해 IL-1을 이용한 연구는 거의 없는 실정이다.²³⁾ 본 연구에서 세 가지 농도로 IL-1을 투여하였고 모두 대조군에 비해 오히려 증식률이 감소하였으며 농도가 증가할수록 증식률이 더 감소하는 양상을 보였으나 통계적으로 의미있는 차이는 아니었다.

성장인자의 투여가 근육모세포의 성장과 분화에 영향을 주는지 확인하기 위해 각 단계별 실험이 끝난 후 근육모세

포가 근관세포로 분화하는 과정을 관찰한 결과 모든 군에서 근관세포로 분화가 이루어져 실험 과정이 근육모세포의 기능에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 좀더 정확한 판정을 위해 근관세포 단백질의 정성적인 분석과 수축 상태 등 기능적 평가가 필요할 것으로 생각된다. 또한 향후 각 성장인자가 상호작용을 하였을 때의 결과를 분석하기 위해서는 성장인자를 동시에 투여하여 근육모세포의 증식 결과를 관찰하는 것이 필요하며 기타 다른 여러 성장인자에 대한 영향 평가가 이루어져야 하겠다.

결 론

성장인자인 bFGF, LIF가 근육모세포의 증식을 촉진시킨 반면 IL-1은 근육모세포의 증식률을 감소시키는 양상을 확인할 수 있었다. 성장인자의 투여 농도에 따른 변화에서 bFGF를 3.0 ng/ml 투여한 경우가 대조군에 비해서 근육모세포의 수가 2.01배로 가장 많이 증가되었으나, 같은 성장인자 내의 투여 농도에 대한 의미 있는 차이는 없었다($p > 0.05$). 또한 성장인자로 처리된 근육모세포가 성장인자가 첨가되지 않은 배양액으로 교체 후 모두 근관세포로 분화되었는데 이는 성장인자가 근육모세포의 분화 기능에는 영향을 미치지 않는다는 사실을 알 수 있었다.

따라서 근육조직에서 적절한 방법으로 근육모세포를 분리한 후 선택적으로 증식시키는 성장인자를 사용한다면 근육모세포의 특성을 변화시키지 않은 상태에서 대량 배양이 가능할 것으로 판단된다. 향후 각 성장인자를 같이 사용하였을 경우의 상승 작용과 이에 따른 근육모세포의 기능에 대한 평가가 좀 더 구체적으로 이루어진다면 근육모세포이식을 위한 근육모세포 배양에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) 박윤길, 김진, 신정식, 문재호: 근육모세포 배양에서 Proline anlaogue와 Cytosine arabinoside의 섬유모세포 제거효과. 대한 재활의학회지 2001; 25: 431-437
- 2) Arahata K, Ishiura S, Ishiguro T, Tsukahara T, Suhara Y, Eguchi C, Ishihara T, Nonak I, Ozawa E, Sugita H: Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. Nature 1988; 333: 861-863
- 3) Austin L, Bower J, Kurek J, Vakakis N: Effects of leukaemia inhibitory factor and other cytokines on murine and human myoblast proliferation. J Neurol Sci 1992; 112: 185-191
- 4) Austin L, Burgess AW: Stimulation of myoblast proliferation in culture by leukaemia inhibitory factor and other cytokines. J Neurol Sci 1991; 101: 193-197
- 5) Beauchamps JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA: Quantitative

- studies of efficacy of myoblast transplantation. *Muscle Nerve* 1994; 18(Suppl.): 261
- 6) Bo X, Chiou GC: Inhibition of fibroblast-like cell proliferation by interleukin-1 blockers, CK-119 and CK-122. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao* 1998; 19: 304-308
 - 7) Chiou GC, Xuan B, Yamasaki T, Okawara T: Anti-inflammation and antifibroblastic actions of interleukin-1 blockers. *J Ocul Pharmacol Ther* 1998; 14: 375-388
 - 8) Dupuy E, Rohrlisch PS, Tobelem G: Heparin stimulates fibroblasts growth induced by platelet derived growth factor. *Cell Biol Int* 1988; 12: 17-28
 - 9) Elias JA: Tumor necrosis factor interacts with interleukin-1 and interferons to inhibit fibroblast proliferation via fibroblast prostaglandin-dependent and -independent mechanisms. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 652-658
 - 10) Fan Y, Maley M, Beilharz M, Grounds M: Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve* 1996; 19: 853-860
 - 11) Gospodarowicz D, Chen J: Growth of myoblasts in lipoprotein-supplemented, serum-free medium: regulation of proliferation by acidic and basic fibroblast growth factor. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987; 23: 507-514
 - 12) Gospodarowicz D, Weseman J, Morgan JS, Lindstrom J: Effects of fibroblast growth factor on the division and fusion of bovine myoblasts. *J Cell Biol* 1976; 70: 395-405
 - 13) Guerette B, Asselin I, Skuk D, Entman M, Tremblay JP: Control of inflammatory damage by anti-LFA-1: Increase success of myoblast transplantation. *Cell Transplant* 1997; 6: 101-107
 - 14) Gussoni E, Blau HM, Kunkel LM: The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. *Nat Med* 1997; 3: 970-977
 - 15) Gussoni E, Pavlath PK, Lancot AM, Sharma K, Miller RG, Steinman L, Blau RM: Normal dystrophin transcripts detected in DMD patients after myoblast transplantation. *Nature* 1992; 356: 435-438
 - 16) Hilton DJ: LIF: Lots of interesting functions. *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 72-76
 - 17) Hoffman EP, Brown J, Kunkel LM: Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919-928
 - 18) Hosenpud JD, Campbell SM, Pan G: Indirect inhibition of myocyte RNA and protein synthesis by interleukin-1. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22: 213-225
 - 19) Huard J, Acsadi G, Jani A, Massie B, Karpati G: Gene transfer into skeletal muscles by isogenic myoblasts. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 949-958
 - 20) Huard J, Bouchard JP, Roy R, Malouin F, Dansereau G, Labrecque C, Albert N, Richards CL, Lemieux B, Tremblay JP: Human myoblast transplantation: preliminary results of four cases. *Muscle Nerve* 1992; 15: 550-560
 - 21) Huard J, Labrecque C, Dansereau G, Robitaille L, Tremblay JP: Dystrophin expression in myotubes formed by the fusion of normal and dystrophic myoblasts. *Muscle Nerve* 1991; 14: 178-182
 - 22) Huard J, Roy R, Bouchard JP, Malouin F, Richards CL, Tremblay JP: Human myoblast transplantation between immunohistocompatible donors and recipients produces immune reactions. *Transplant Proc* 1992; 24: 3049-3051
 - 23) Ji SQ, Neustrom S, Willis GM, Spurlock ME: Proinflammatory cytokines regulate myogenic cell proliferation and fusion but have no impact on myotube protein metabolism or stress protein expression. *J Interferon Cytokine Res* 1998; 18: 879-888
 - 24) Karpati G, Ajdukovic D, Arnold D, Gledhill RB, Guttmann R, Holland P, Koch PA, Shoubridge E, Spence D, Vanasse M: Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 1993; 34: 8-17
 - 25) Kurek JB, Bower JJ, Romanella M, Koentgen F, Murphy M, Austin L: The Role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve* 1997; 20: 815-822
 - 26) Law PK, Goodwin TG, Fang Q, Chen M, Li HJ, Florendo A, Kirby D, Bertorini T, Herred H, Golden G: Pioneering development of myoblast transfer therapy. In: Angelini C, Darrieli GA, Fontanan D. editors. *Muscular dystrophy research*. New York: Elsevier Science Inc., 1991, pp109-116
 - 27) Liu Q, Zhou YH, Xuan B, Chiou GC, Okawara T: Effects of interleukin-1 blockers on corneal fibroblast proliferation in vitro and ocular inflammation in vivo. *J Ocul Pharmacol Ther* 2000; 16: 81-96
 - 28) Matthey DL, Evans E, Dawes PT: The effects of Tenidap on cytokine induced proliferation of human synovial fibroblasts in vitro. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 250-255
 - 29) Mendell JR, Kissel JT, Amato AA, King W, Signore L, Prior TW, Sahenk Z, Benson S, McAndrew PE, Rice R: Myoblast transfer in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *N Eng J Med* 1995; 333: 832-838
 - 30) Merly F, Huard C, Asselin I, Robbins PD, Tremblay J: Anti-inflammatory effect of transforming growth factor-beta1 in myoblast transplantation. *Transplantation* 1998; 65: 793-799
 - 31) Metacalf D: Leukemia inhibitory factor-a puzzling polyfunctional regulator. *Growth Factors* 1992; 7: 169-173
 - 32) Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM: Isolation of candidate cDNAs for portion of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 1986; 323: 646-650
 - 33) Morgan JE, Hoffman EP, Partridge TA: Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerating muscle of the mdx mouse. *J Cell Biol* 1990; 111: 2437-2449
 - 34) Nagasaki T, Lieberman MA: Growth-stimulatory action of plasmamembrane-associated growth factor. A synergistic effect with platelet-poor plasma. *Exp Cell Res* 1987; 170: 170-174
 - 35) Palmer JN, Hartogensis WE, Patten M, Fortuin FD, Long CS: Interleukin-1 beta induces cardiac myocyte growth but inhibits

- cardiac fibroblast proliferation in culture. *J Clin Invest* 1995; 95: 2555-2564
- 36) Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM: Conversion of mdx myofibers from dystrophin negative to positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 1989; 337: 176-179
- 37) Rameshwar P, Poddar A, Zhu G, Gascon P: Receptor induction regulates the synergistic effects of substance P with IL-1 and platelet-derived growth factor on the proliferation of bone marrow fibroblasts. *J Immunol* 1997; 158: 3417-3424
- 38) Rubinchik E, Levi-Schaffer F: Interleukin-2 inhibits 3T3 fibroblast proliferation. *Life Sci* 1996; 58: 1509-1517
- 39) Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I: Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* 1982; 128: 2177-2182
- 40) Schmitz B, Thiele J, Witte O, Kaufmann R, Wickenhauser C, Fischer R: Influence of cytokines (IL-1 alpha, IL-3, IL-11, GM-CSF) on megakaryocyte-fibroblast interactions in normal human bone marrow. *Eur J Haematol* 1995; 55: 24-32
- 41) Smythe GM, Hodgetts SI, Grounds MD: Immunology and the future of myoblast transfer therapy. *Mol Ther* 2000; 1: 304-313
- 42) Strutz F, Zeisberg M, Hemmerlein B, Sattler B, Hummel K, Becker V, Muller GA: Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int* 2000; 57: 1521-1538
- 43) Thomas MA, Fast A, Bach JR: Rehabilitation of the patient with disease of the motor unit. In: DeLisa JA, Gans BM, editors. *Rehabilitation medicine: principles and practice*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Company, 1993, pp1564-1568
- 44) Tremblay JP, Guerette B: Myoblast transplantation: a brief review of the problems and of some solutions. *Basic Appl Myol* 1997; 7: 221-230
- 45) Tremblay JP, Malouin F, Roy R, Huard J, Bouchard JP, Satoh A, Richards CL: Results of a blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant* 1993; 2: 99-112
- 46) Watt DJ, Lambert K, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC: Incorporation of donor muscle precursor cells into an area of muscle regeneration in the host mouse. *J Neurol Sci* 1982; 57: 319-331
- 47) Watt DJ, Morgan JE, Partridge TA: Use of mononuclear precursor cells to insert allogeneic genes into growing mouse muscles. *Muscle Nerve* 1984; 7: 741-750
- 48) Weintraub H: The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 1993; 75: 1241-1244
- 49) Yoshida S, Fujisawa-Sehara A, Taki T, Arai KI, Nabeshima Y: Lysophosphatidic acid and bFGF control different modes in proliferating myoblasts. *J Cell Biol* 1996; 132: 181-193
- 50) Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G, Burghes AH, Belfall B, Klamut HJ, Talbot J, Hodges RS, Ray PN, Worton RG: The Duchenne muscular dystrophy gene is localized in the sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 1988; 333: 466-469